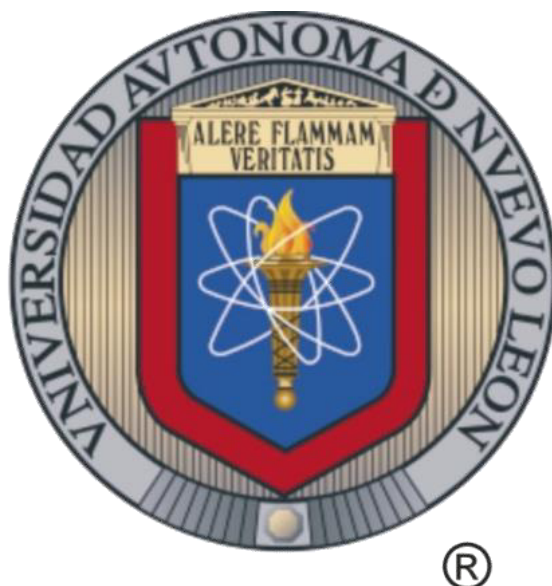


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**IDENTIFICACIÓN E INCIDENCIA DE VIRUS PATÓGENOS EN EL CULTIVO  
DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.) EN ARAMBERRI, NUEVO LEÓN**

**PRESENTA  
ABIGAIL ESMERALDA AGUILAR ROCHA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**OCTUBRE, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**IDENTIFICACIÓN E INCIDENCIA DE VIRUS PATÓGENOS EN EL CULTIVO  
DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.) EN ARAMBERRI, NUEVO LEÓN**

**PRESENTA  
ABIGAIL ESMERALDA AGUILAR ROCHA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA  
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**OCTUBRE, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**IDENTIFICACIÓN E INCIDENCIA DE VIRUS PATÓGENOS EN EL CULTIVO  
DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.) EN ARAMBERRI, NUEVO LEÓN**

**PRESENTA  
ABIGAIL ESMERALDA AGUILAR ROCHA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**OCTUBRE, 2019**

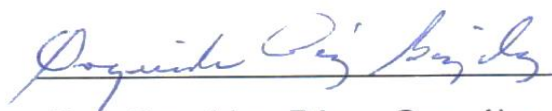
**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL  
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
COMITÉ PARTICULAR**



---

Dr. Omar G. Alvarado Gómez

Director



Dra. Orquídea Pérez González

Co-Directora

---

M.C. Jesús Andrés Pedroza Flores

Asesor

---

Dr. Ramiro González Garza

Asesor externo

---

Ph. D. Juan Antonio Vidales Contreras  
Subdirector de Posgrado e Investigación

## **DEDICATORIA**

En primer lugar a Dios, porque su voluntad siempre es perfecta y ha cuidado de mí en todo momento, así como me ha permitido concluir este ciclo en mi vida y ámbito profesional.

A mis padres Valdemar I. Aguilar Martínez y Ma. Ascensión Rocha Loredó por su apoyo y consejos tan valiosos que han transmitido importantes valores en mi trayecto de vida, igualmente a mi hermana y hermano por su cariño que han alegrado cada uno de mis días.

A mi esposo Luis Alejandro Carranza Vélez, por su amor y paciencia en esta etapa importante de mi vida.

A mis apreciables maestros, tanto de licenciatura como de maestría, que sin el conocimiento adquirido y dedicación de cada uno de ellos no hubiera podido llegar a tener la experiencia que me ha formado como profesionista y como persona.

## **AGRADECIMIENTO**

Es un privilegio agradecer a los maestros integrantes del Comité de Tesis por sus aportaciones al presente trabajo de investigación y por haber compartido su experiencia en dicho proyecto.

Al personal de la Unidad Académica La Ascensión de la FAUANL por las facilidades otorgadas para los muestreos del estudio y en particular al Ing. Efrén Montaña Acosta por sus aportaciones sobre el cuidado del cultivo de ajo.

A mis compañeros de posgrado por su amistad y ayuda en labores de campo, así como los momentos que pasamos juntos y los que faltan por vivir.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.    Objetivos .....	3
1.2.    Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1. Importancia del cultivo del ajo en el mundo .....	4
2.2. El cultivo del ajo en México y en Nuevo León.....	6
2.3. Virosis en ajo .....	11
2.3.1. Síntomas y daños de virosis en ajo .....	13
2.4. Diagnóstico de virus .....	17
2.4.1. Métodos biológicos .....	17
2.4.2. Métodos serológicos: ELISA .....	19
2.4.3. Métodos moleculares: RT-PCR.....	22
2.5. Formas de transmisión.....	23
2.5.1. Propagación vegetativa.....	23
2.5.2. Vectores .....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. Localización de los experimentos y muestreo de plantas.....	27
3.2. Análisis de las muestras vegetales .....	29
3.2.1. ELISA.....	29
3.2.2. RT-PCR y secuenciación de ADN .....	30
3.2.2.1. Extracción de ARN .....	30
3.2.2.2. Reacciones de RT-PCR .....	33
3.2.2.3. Electroforesis en geles de agarosa y secuenciación de ADN .....	33
3.3. Muestreo y análisis de trips .....	34
3.3.1. Montaje e identificación de trips .....	34

3.3.2. Diagnóstico del IYSV .....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
4.1. Ciclo 2016/2017 .....	37
4.2. Ciclo 2017/2018 .....	44
4.3. Incidencia de trips y del virus IYSV .....	44
5. CONCLUSIONES .....	46
6. BIBLIOGRAFÍA .....	48



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Producción de ajo en México por estados en 2018 (SIAP, 2018).....	7
2	Superficie, producción y rendimiento de ajo en México durante los últimos 10 años (SIAP, 2018).....	8
3	Virus asociados con plantas de ajo (Pramesh y Baranwal, 2015; Hu <i>et al.</i> , 2015; Velazquez <i>et al.</i> , 2010).....	12
4	Primers usados en las pruebas de RT-PCR para la amplificación de virus en ajo (Nam <i>et al.</i> , 2015, Dai <i>et al.</i> , 2012).....	32
5	Resultados del análisis de muestras por RT-PCR durante el ciclo 2016/2017.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Plantas de ajo mostrando sus raíces, bulbos, tallos y hojas.....	4
2	Distribución de la producción de ajo en el mundo.....	5
3	Superficie y producción de ajo en el mundo durante los años 2007 al 2017.....	6
4	Proporción de producción de ajo por región.....	6
5	Producción total nacional de ajo durante los últimos 10 años .....	8
6	Producción de ajo en el estado de Nuevo León y en el municipio Aramberri del año 2009 al 2018.....	9
7	Cultivo de ajo en el Campo Experimental de la Unidad Académica La Ascensión de la FAUANL durante el ciclo otoño-invierno 2016/2017.....	10
8	Partículas de GMbMV teñidas negativamente con PTA al 2%, vistas al microscopio electrónico. ....	11
9	Comparación de sintomatología entre plantas de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) .....	13
10	Variación de los síntomas de Potyvirus en el ajo infectado naturalmente dependiendo de la virulencia de los aislamientos.....	14
11	GCLV y SLV vistos al microscopio electrónico.....	15
12	Síntomas de IYSV en cebolla.....	16
13	Síntomas del PRSV .....	19
14	Síntomas asociados con el virus tristeza de los cítricos .....	19
15	Prueba ELISA .....	20
16	Detección simultánea de OYDV, SLV, GarCLV y Allxivirus en ajo, por RT-PCR múltiple .....	23
17	Propagación vegetativa del ajo. ....	24
18	Adulto de <i>Thrips tabaci</i> L.....	25

Figura		Página
19	Alimentación en <i>Aceria tulipae</i> .....	26
20	Ubicación del municipio de Aramberri, Nuevo León .....	27
21	Muestras recolectadas para su análisis .....	28
22	Diagramas de placas y resultados de la prueba ELISA para el análisis de virus en ajo .....	38
23	Tasa de coinfección de virus en muestras de ajo .....	40
24	Resultados obtenidos del análisis de 54 muestras de ajo por RT-PCR durante el ciclo 2017/2018 .....	41
25	Resultados de RT-PCR múltiple para diferentes virus del ajo durante el ciclo 2017/2018 .....	42
26	Resultados de RT-PCR individual para virus TEV. ....	42
27	Comparación con secuencias del GenBank de las secuencias obtenidas de productos de RT-PCR del virus GarV-D en muestras de ajo de Aramberri, N.L.....	44
28	Observación de un espécimen de <i>Thrips sp.</i> al microscopio compuesto.....	45

## RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta de importancia mundial y nacional debido a su amplia distribución y a su extensa superficie cultivada, así como su producción. Sin embargo, es afectado por enfermedades causadas por virus que provocan la reducción en el tamaño y la calidad del bulbo.

En el municipio de Aramberri del estado de Nuevo León, se sembraron las variedades Tigre, Fermín, California y Criollo La Trina durante los ciclos agrícolas 2016/2017 y 2017/2018. Se recolectaron 4 muestras de las 4 variedades de estudio al final del ciclo 2016/2017 y se analizaron utilizando las técnicas ELISA y RT-PCR. Durante el ciclo 2017/2018, se recolectaron 54 muestras de bulbillos y hojas al momento de la siembra, a la mitad del ciclo de cultivo y durante la cosecha. También se identificaron y cuantificaron trips, los cuales son los principales vectores del tospovirus IYSV. Todas las muestras fueron analizadas individualmente mediante la técnica RT-PCR para seis virus.

En ciclo agrícola 2016/2017, solo se encontró el virus TEV por ELISA, en cambio por RT-PCR se detectó la presencia de Allexivirus en las cuatro variedades, OYDV solamente en Criollo La Trina, SLV en Tigre y Fermín, y TEV en Tigre, Fermín y California. Para el ciclo 2017/2018 los resultados corroboraron la presencia de dos a cinco virus simultáneos tanto en bulbillos como en las hojas: SLV, LYSV, TEV, OYDV y GarV-D, con porcentaje de incidencia del 66.7, 85.2, 94.4, 100 y 100 respectivamente. No se detectó el virus GarCLV, y se observaron diferencias en la

incidencia viral entre las tres variedades. La parcela tuvo una incidencia de trips en el 100% de las plantas muestreadas, pero ningún espécimen portaba al virus IYSV.

## ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is a plant of global and national importance due to its wide distribution and extensive cultivated area as well as its production. However, it has been affected by diseases caused by viruses that cause the reduction in the size and quality of the bulb.

In the municipality of Aramberri in the state of Nuevo León, the varieties Tigre, Fermín, California and Creole La Trina were sown during the 2016/2017 and 2017/2018 agricultural cycles. We collected 4 samples of 4 varieties during 2016/2017 harvest and were analyzed by ELISA and RT-PCR techniques. During 2017/2018 period, we collected 54 samples of bulbills and leaves were collected at the time of planting, in the middle of the crop cycle and during harvest. Thrips were also identified and quantified, which are the main vectors of IYSV tospovirus. All samples were analyzed individually using the RT-PCR technique for six viruses.

In the 2016/2017 agricultural cycle, we only find TEV virus by ELISA, otherwise by RT-PCR we found Allexivirus in the four varieties, OYDV only in Creole La Trina, SLV in Tigre and Fermín, TEV in Tigre, Fermín and California. For the 2017/2018 cycle, the results corroborated the presence of two to five simultaneous viruses in both bulbills and leaves: SLV, LYSV, TEV, OYDV and GarV-D, with an incidence rate of 66.7, 85.2, 94.4, 100 and 100 % respectively. The GarCLV virus was not detected, and differences in viral incidence were observed between the varieties. The plot had an incidence of thrips in 100% of the sampled plants, however, no specimen carried the IYSV virus.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta que se distingue por sus usos medicinales y como ingrediente básico de muchos platillos alimenticios. Su cultivo tiene una distribución mundial. Comercialmente se aprovecha el bulbo, también conocido como “cabeza” (García-Alonso, 1998). Los países de China, India y Bangladesh son los principales productores de ajo en el mundo, mientras que México ocupa el lugar número 20 con una producción de más de 75 mil toneladas (FAOSTAT, 2017). A nivel nacional los estados de Zacatecas, Guanajuato y Sonora ocupan los primeros tres lugares en producción.

En Nuevo León se ha incrementado la superficie sembrada de ajo en los últimos once años, pasando de 38 has en 2007 a 257 has en 2018. En el ciclo agrícola 2017-2018 en el estado de Nuevo León se obtuvo una producción de 2,613 ton, de las cuales el 78.4% de la superficie cosechada se localizó en el municipio de Aramberri (SIAP, 2018).

Al igual que otros cultivos propagados vegetativamente, el ajo es susceptible a enfermedades virales ya que la infección viral tiende a acumularse en los ciclos sucesivos de propagación, causando pérdidas considerables de rendimiento y deterioros en la calidad del bulbo (Walkey y Antil, 1989; Conci *et al.*, 2003; Celli *et al.* 2016). A nivel mundial se han identificado 16 virus asociados con el ajo pertenecientes a cinco géneros. Las infecciones mixtas causan síntomas en las hojas tales como

mosaicos, rayas cloróticas, moteado, enchinamiento y atrofia de la planta, llevando a la formación de pequeños bulbos y bulbillos, y a la reducción del peso del bulbo hasta en un 78%. Por lo anterior, la siembra de semilla libre de virus es vital para mantener la productividad (Pramesh y Baranwal, 2015; Hu *et al.*, 2015).

Los métodos confiables, rápidos y rentables para la detección de virus del ajo juegan un papel importante en el control y manejo de las enfermedades virales. El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa de la transcripción reversa (RT-PCR) se han utilizado para el diagnóstico de los virus del ajo (Dovas *et al.*, 2001; Majumder y Baranwal, 2014; Nam *et al.*, 2015). Sin embargo, los antisueros utilizados en el método de ELISA no siempre están disponibles para todos los virus y su diagnóstico se vuelve complejo debido a las múltiples infecciones virales; en cambio la RT-PCR ha demostrado ser más sensible al detectar los virus en muy bajas concentraciones.

En México existen reportes de seis virus en ajo en los estados de Guanajuato y Zacatecas. En el estado de Guanajuato, se han identificado por ELISA los Potyvirus OYDV y LYSV, este último corroborado por PCR (Pérez *et al.*, 2006); además de los Carlavirus SLV y GarCLV, y el Tospovirus IYSV; estos virus han causado alrededor del 20% de reducción en la producción (Pérez *et al.*, 2010). Por otra parte, en el estado de Zacatecas se han detectado los virus OYDV, GarCLV, SLV, LYSV, y el virus del jaspeado del tabaco (TEV) pero solo ha sido utilizada la técnica ELISA (Velásquez *et al.*, 2010).



En el estado de Nuevo León no existe información sobre la situación sanitaria del cultivo de ajo y menos aún sobre enfermedades ocasionadas por virus y por lo tanto se desconocen también los daños actuales y potenciales.

### **1.1. Objetivos**

El objetivo general de esta investigación fue detectar e identificar los virus presentes en el cultivo de ajo en el municipio de Aramberri, Nuevo León, y estimar su incidencia.

Los objetivos particulares fueron:

- a) Identificar los virus presentes en el municipio de Aramberri, en cuatro variedades de ajo: Tigre, Fermín, California y Criollo La Trina.
- b) Estimar la incidencia de los virus presentes en el área de estudio.
- c) Analizar la presencia del virus IYSV en plantas de ajo y en especímenes de trips.

### **1.2. Hipótesis**

Las plantas de ajo y los trips asociados a ellas del Campo Experimental de la Unidad Académica La Ascensión, en Aramberri, N.L. contienen uno o más virus los cuales pueden ser identificados a nivel de especie, y se puede estimar la incidencia de las plantas infectadas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Importancia del cultivo del ajo en el mundo

El ajo (*Allium sativum* L.) tiene su origen en Asia central, es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial, y se aprovechan sus bulbillos o “dientes” que integran el bulbo (figura 1). Su principal uso es como condimento en los alimentos y se comercializa en fresco, en forma de pasta y en polvo (García-Alonso, 1998); también como suplemento alimenticio en cápsulas debido a sus propiedades benéficas para la salud por ejemplo, en el sistema cardiovascular (Thomson *et al.*, 2006).



Figura 1. Plantas de ajo mostrando su raíz, bulbos, tallo y hojas.

Esta planta ha sido cultivada alrededor del mundo desde épocas pasadas, y en la actualidad se cosecha en más de 100 países, sus principales productores son China con más de 21.1 millones de ton, le sigue India con 1.4 millones y Bangladesh con 381 mil tons al año (figura 2).

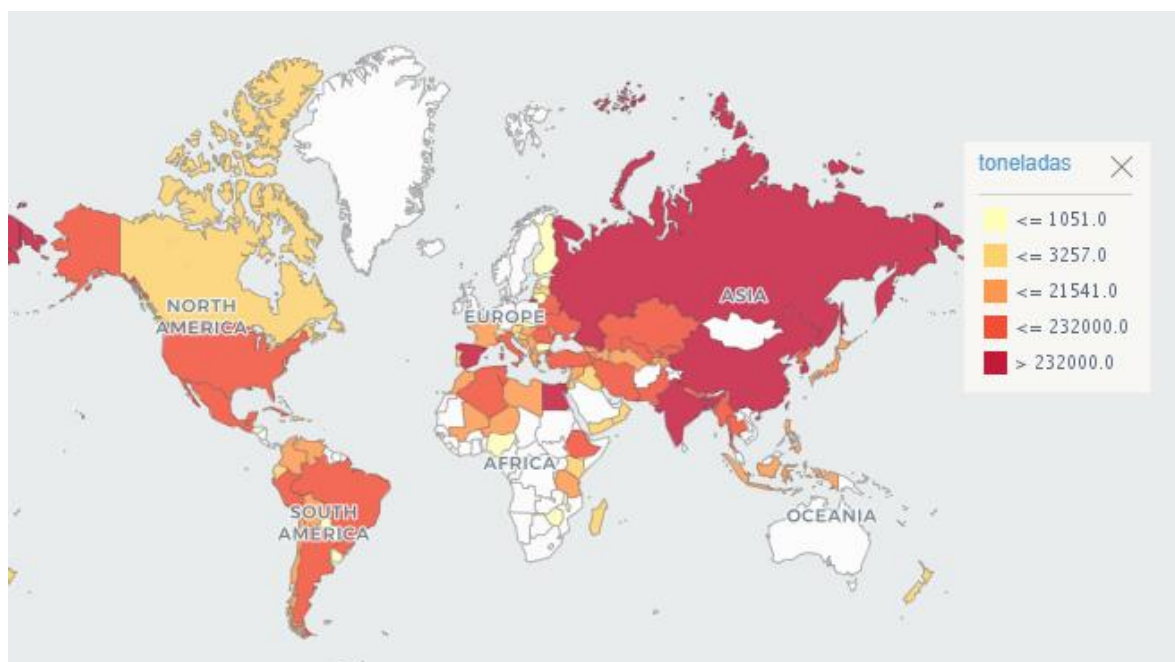


Figura 2. Distribución de la producción de ajo en el mundo (FAOSTAT, 2017).

Asimismo, se puede observar su importancia en los últimos 10 años, con el incremento en la superficie cultivada y su producción de 1.3 millones de has y 20 millones de tons respectivamente en el año 2007, a 1.57 millones de has y 28 millones de tons para el 2017; siendo el continente asiático quien conserva la mayoría en estos dos rubros (figuras 3 y 4).



Figura 3. Superficie y producción de ajo en el mundo durante los años 2007 al 2017 (FAOSTAT, 2017).

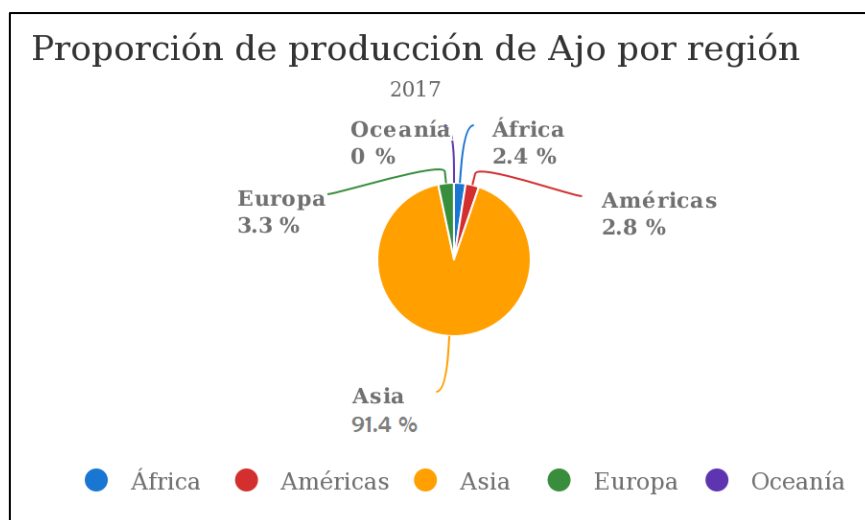


Figura 4. Proporción de producción de ajo por región (FAOSTAT, 2017).

## 2.2. El cultivo del ajo en México y en Nuevo León

México es el país que ocupa el lugar número 20 en producción de ajo a nivel mundial (FAOSTAT, 2017). Los principales estados productores son Zacatecas con

55,327 tons de producción en el año 2018, le sigue Guanajuato con 10,732 y Sonora con 5,291 (SIAP, 2018) (cuadro 1).

Cuadro 1. Producción de ajo en México por estados en 2018 (SIAP, 2018).

Estado	Superficie cosechada (has)	Producción (tons)
Zacatecas	3,358	55,327
Guanajuato	981	10,732
Sonora	575	5,291
Puebla	526	4,132
Baja California	312	3,242
Nuevo León	253	2,613
Aguascalientes	135	1,694
Oaxaca	188	1,384
Veracruz	92	1,384
San Luis Potosí	126	1,320
Querétaro	95	814
Hidalgo	79	675
Chihuahua	48	351
Guerrero	75	291
Jalisco	19	279
Tlaxcala	41	153
Baja California Sur	8	75
Coahuila	6	58
Michoacán	4	22
Durango	1	6

Este cultivo ha tenido un crecimiento importante durante los últimos 10 años como podemos observar en la figura 5, una diferencia de más de 36 mil tons producidas desde el año 2009 al 2018, y un crecimiento de la superficie de 1,461 has durante el mismo período (cuadro 2) (SIAP, 2018).



Figura 5. Producción total nacional de ajo durante los últimos 10 años (SIAP, 2018).

Cuadro 2. Superficie, producción y rendimiento de ajo en México durante los últimos 10 años (SIAP, 2018).

Año	Superficie cosechada (has)	Producción (tons)	Rendimiento (tons/ha)
2009	5,427	52,924	9.751
2010	4,632	45,178	9.753
2011	5,521	57,677	10.447
2012	5,146	55,518	10.788
2013	5,027	55,790	11.097
2014	5,058	51,435	10.170
2015	5,203	55,117	10.594
2016	6,095	71,496	11.731
2017	6,829	85,430	12.510
2018	6,888	89,390	12.977

México exporta esta valiosa hortaliza a los Estados Unidos de América casi 14 mil tons, así como a Australia envía 1,341, a Brasil 947 y Francia recibe 475 tons;

aportando todo lo anterior un valor aproximado de 19 millones de dólares (FAOSTAT, 2017).

En el caso específico del estado de Nuevo León, como se mencionó en el cuadro 1, en el año 2018 subió al lugar 6 en el país con un total de 253 has cosechadas y obtenido 2,613 tons; aclarando que en los últimos 10 años ha tomado importancia en la parte sur del estado, principalmente en los municipios de Galeana y Aramberri, éste último municipio contribuye con el 78% de la producción estatal (figura 6) (SIAP, 2018).

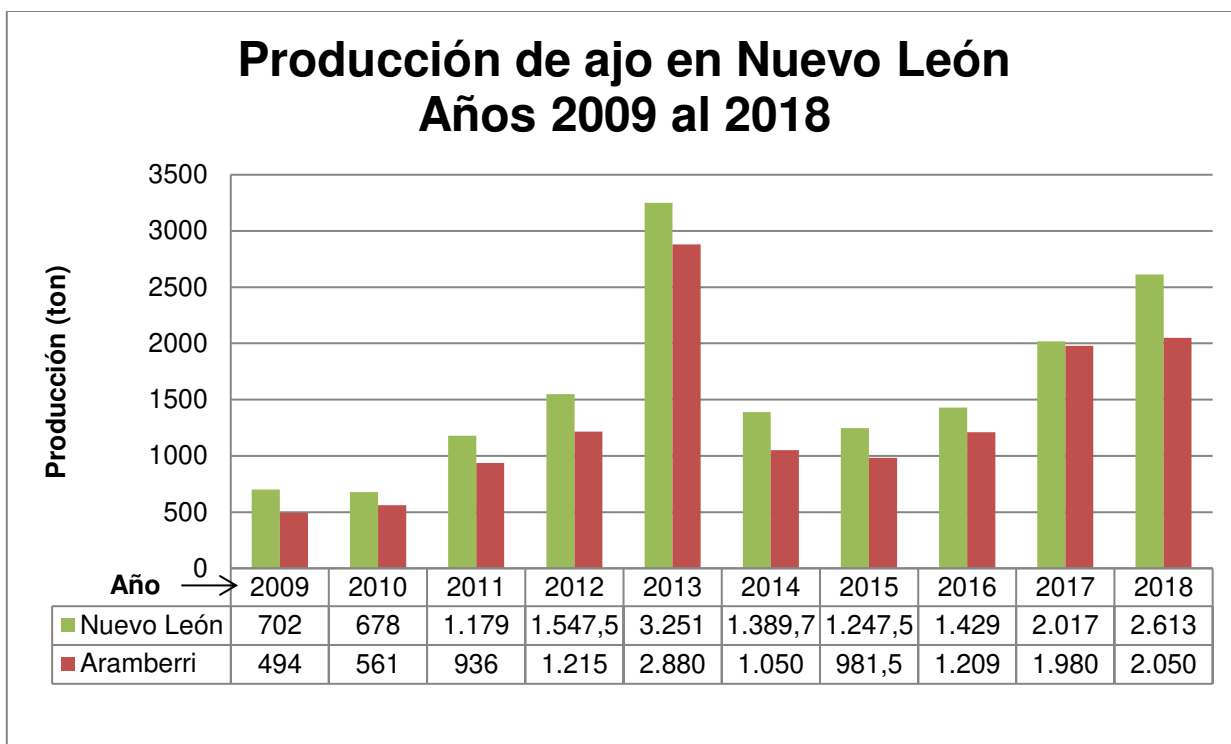


Figura 6. Producción de ajo en el estado de Nuevo León y en el municipio de Aramberri del año 2009 al 2018 (SIAP, 2018).

Las variedades que se siembran en la mayor parte de Nuevo León son Tigre y Fermín; éstas tienen características similares, los bulbos son morados, hojas verde-cenizo semi erectas, su inflorescencia es morada, producen hasta 18 bulbillos por bulbo con un promedio de 13. Una de las diferencias entre ambas variedades consiste en que la variedad Fermín es más precoz, y se cosecha dos semanas antes que Tigre. Otras dos variedades sembradas en menor proporción son California y Criollo las cuales se desconoce su origen y su morfología precisa, pero la primera manifiesta bulbos con deformidades, la planta no presenta vástago y tarda un mes más en cosecharse; y la segunda tiene inflorescencia morada, no presenta vástago y se cosecha un mes antes que Tigre (figura 7) (Ing. Efrén Montaña A., comunicación personal).



Figura 7. Cultivo de ajo en el Campo Experimental de la Unidad Académica La Ascensión de la FAUANL durante el ciclo 2016/2017. Variedades en orden de aparición por surco de izquierda a derecha: Tigre, California, Criollo La Trina y Fermín.



### 2.3. Virosis en ajo

Una de las principales causas del bajo rendimiento en el cultivo del ajo se debe a la presencia de virus y a su intervención en el metabolismo de las plantas. Los virus son nucleoproteínas que se propagan sólo en el interior de células vivas alterando su metabolismo induciendo que produzcan sustancias anormales y generan condiciones que influyen negativamente sobre la planta, su tamaño es tan pequeño que no puede ser visto en el microscopio óptico, solamente con el microscopio electrónico (figura 8) (Agrios, 2005).

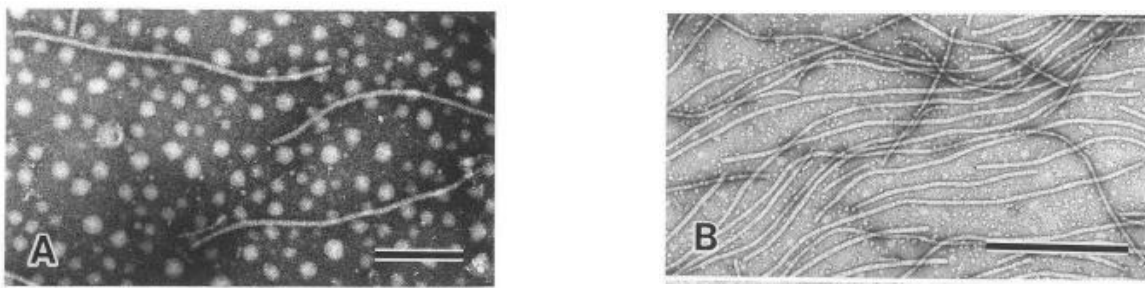


Figura 8. Partículas de GMbMV teñidas negativamente con PTA al 2%, vistas al microscopio electrónico. (A) Partículas en savia de *Chenopodium murale*. La barra representa 200 nm. (B) Partículas en una preparación de virus purificado. La barra representa 500 nm (tomado de Yamashita *et al.*, 1996).

A nivel mundial se han detectado y reportado 16 virus fitopatógenos asociados con el ajo pertenecientes a las familias Allexivirus, Potyvirus, Carlavirus, Tospovirus y Fijivirus (Pramesh y Baranwal, 2015; Hu *et al.*, 2015; Velazquez *et al.*, 2010) (cuadro 3).

Cuadro 3. Virus asociados con plantas de ajo (Pramesh y Baranwal, 2015; Hu *et al.*, 2015; Velazquez *et al.*, 2010).

Género	Nombre inglés	Nombre español	Acrónimo
Allexivirus	Garlic virus – A	Virus del ajo – A	GarV–A
	Garlic virus – B	Virus del ajo – B	GarV–B
	Garlic virus – C	Virus del ajo – C	GarV–C
	Garlic virus – D	Virus del ajo – D	GarV–D
	Garlic virus – E	Virus del ajo – E	GarV–E
	Garlic virus – X	Virus del ajo – X	GarV–X
	Shallot virus X	Virus del shallot X	ShVX
	Garlic mite-borne filamentous virus	Virus filamentosos transmitido por ácaros del ajo	GarMbFV
	Onion yellow dwarf virus	Virus del enanismo amarillo de la cebolla	OYDV
Potyvirus	Leek yellow stripe virus	Virus rayado amarillo del puerro	LYSV
	Tobacco etch virus	Virus jaspeado del tabaco	TEV
	Shallot Yellow Stripe Virus	Virus de la franja amarilla del shallot	SYSV
Carlavirus	Garlic common latent virus	Virus latente común del ajo	GarCLV
	Shallot latent virus	Virus latente del shallot	SLV
Tospovirus	Irish yellow spot virus	Virus manchado amarillo del iris	IYSV
Fijivirus	Garlic dwarf virus	Virus enano del ajo	GDV

Sin duda, el ajo ha sido hospedante de virus causando daño a veces visible y otras veces asintomático (figura 9) (Pérez *et al.*, 2008); asimismo pueden presentarse de uno a cuatro o más virus simultáneamente en la misma planta llegando a causar una disminución hasta de un 61% en el peso del bulbo y reducciones del diámetro del 37% (Lot *et al.*, 1998; Conci *et al.*, 2003; Cafrune *et al.*, 2006).

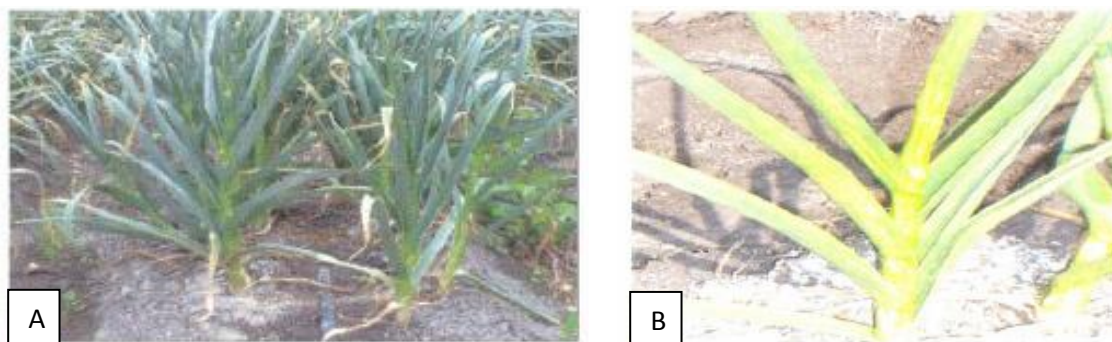


Figura 9. Comparación de sintomatología entre plantas de ajo (*Allium sativum*) A) aparentemente sanas (asintomáticas) y B) plantas con sintomatología de virosis infectadas por los virus LYSV, OYDV, GarCLV y SLV, en Irapuato, Guanajuato, México (tomado de Pérez *et al.*, 2008).

### 2.3.1. Síntomas y daños de virosis en ajo

Dentro del género *Allexivirus* se encuentran los virus GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X, ShVX y GarMbFV, los cuales son transmitidos por ácaros y se caracterizan por producir una serie de mosaicos a lo largo de las hojas y también por afectar en la reducción del tamaño del bulbo. Los virus GarV-A y GarV-C reducen del 14-22% el peso del bulbo y del 6 al 11% en el diámetro del bulbo (Cafrune *et al.*, 2006). Es importante mencionar que GarMbFV es transmitido por el ácaro *Aceria tulipae* (Yamashita *et al.*, 1996; Celli *et al.*, 2016).

Con respecto al género *Potyvirus*, el OYDV, se puede identificar por la aparición de franjas de color amarillo claro y verde claro en la mayoría de las hojas, con secado prematuro de la punta de la hoja; de forma similar está el LYSV el cual ocasiona franjas de color amarillo claro en la parte distal de las hojas más viejas e intermedias (Lot *et*

*al.*, 1998); y el SYSV las manifiesta en hojas jóvenes (Van Dijk, 1993a) (figura 10). Con respecto al virus TEV, existe poca información relacionada con el cultivo de ajo debido a que se le relaciona más con el tabaco, y solo ha sido reportado en ajo en el estado de Zacatecas, las plantas portadoras con este virus mostraron síntomas como achaparramiento, follaje de apariencia cerosa, deformación foliar y bulbo con poca diferenciación de dientes (Velásquez *et al.*, 2010).

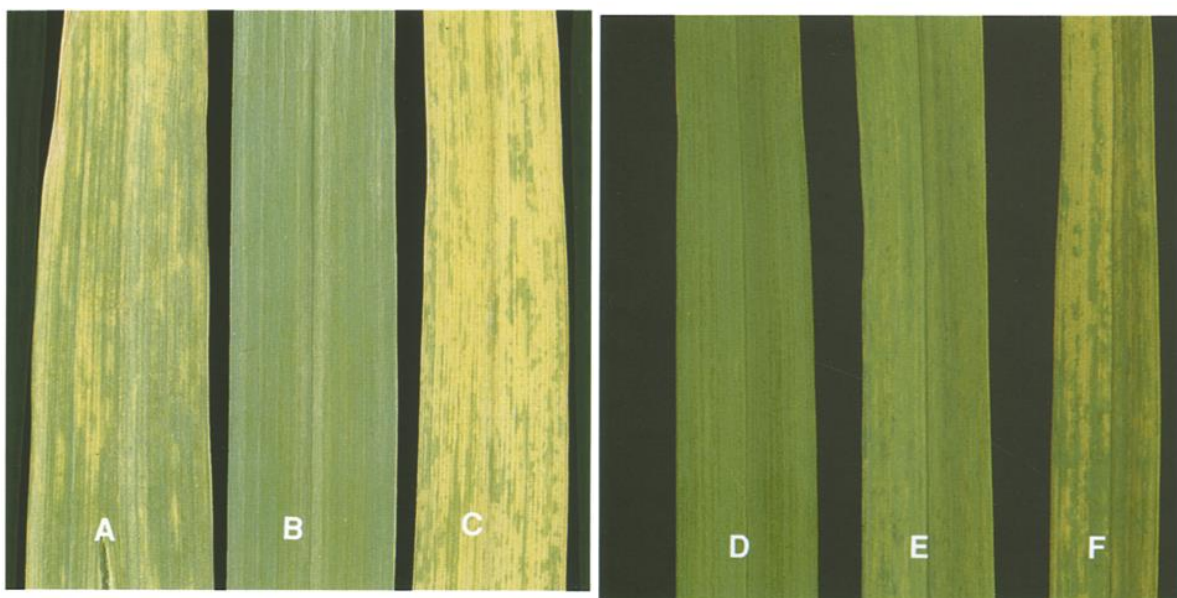


Figura 10. Variación de los síntomas de Potyvirus en el ajo infectado naturalmente dependiendo de la virulencia de los aislamientos. “Thermidrome” (A-C) y “Sud-est Rouge” (D-F) con la cepa de ajo del virus LYSV, la cepa de ajo del virus OYDV, y aislados leves de ambos juntos (E). B y D no infectados con Potyvirus (tomado de Van Dijk, 1993a).

Los virus GarCLV y SLV pertenecen al género Carlavirus (figura 11), y es posible identificarlos mediante unas manchas anulares cloróticas con centro necrótico distribuidas en la hoja (Van Dijk, 1993b).

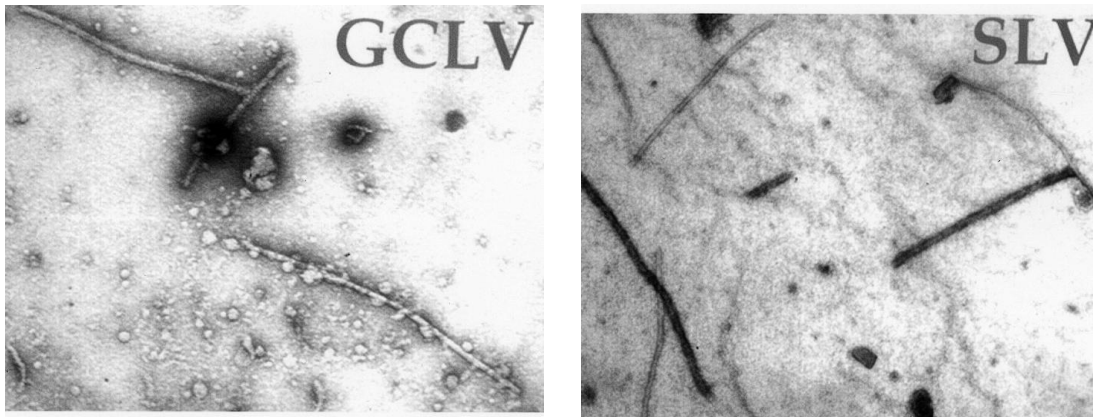


Figura 11. GCLV y SLV vistos al microscopio electrónico (tomado de Salomon, 2002).

Por otra parte, el virus IYSV, perteneciente al género Tospovirus (virus transmitidos por trips); produce en etapas tempranas lesiones cloróticas o necróticas de color amarillo a color pajizo, alargadas, lenticulares o en forma de huso, desde la parte media a la parte inferior de la planta infectada. A medida que la enfermedad se desarrolla y las plantas crecen, las lesiones se alargan y se unen, cubriendo todo el largo de la hoja. A veces, el tejido verde en el centro de las lesiones está presente en la forma de un diamante que podría usarse como una característica de diagnóstico (Bag *et al.*, 2015) (figura 12).

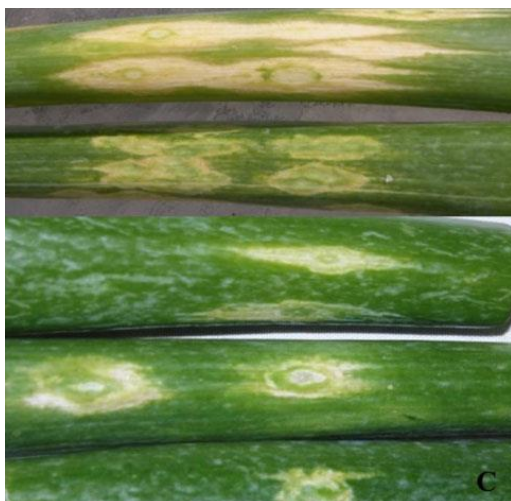


Figura 12. Síntomas de IYSV en cebolla (tomado de Bag *et al.*, 2015).

Finalmente, el GDV, de la familia Fijivirus; tiene como su único hospedero al ajo, y causa un complejo de síntomas descrito como el síndrome de la enana de ajo. Las plantas enfermas son muy pequeñas y con las hojas engrosadas. La mayoría de las hojas muestran un color verde más oscuro, y algunas de ellas hinchazones o venas. Las plantas se parecen a los tulipanes ya que las hojas parecen insertarse en el mismo punto, y no se observa ningún tallo falso como en las plantas no afectadas. Las hojas jóvenes suelen tener puntas moradas. En etapas avanzadas del cultivo, las plantas con hojas más viejas aparentemente normales a veces desarrollan entrenudos más cortos, una apariencia delgada y bulbos esponjosos con forma de pera que contienen pocos bulbillos (Katis *et al.*, 2012)

## **2.4. Diagnóstico de virus**

Las reducciones en producción y las pérdidas económicas que son ocasionadas a causa de los virus fitopatógenos han tomado gran importancia a nivel mundial, por lo que es necesario el desarrollo de métodos de diagnóstico efectivos y precisos para tomar las decisiones que puedan prevenir su propagación.

### **2.4.1. Métodos biológicos**

El uso de métodos biológicos para diagnosticar enfermedades causadas por virus fueron los primeros en practicarse a partir del año 1886 con Meyers, quien inyectó savia infectada por el virus del mosaico del tabaco (TMV) en plantas sanas confirmando la aparición de los mismos síntomas que la planta enferma. Por lo tanto, la sintomatología y las plantas indicadoras son los dos tipos de diagnóstico que se incluyen este método (González-Garza, 2017).

El virus más común identificado a través de la sintomatología fue el TMV a finales del siglo XIX, este virus al infectar produce necrosis localizada en las hojas, que se ven como un mosaico oscuro con fondo verde. Sin embargo, conforme se ampliaron las investigaciones en otros virus, se observaron que había similitudes en los síntomas o inclusive esos mismos síntomas podían responder parecido a condiciones desfavorables del clima, deficiencias nutricionales y del suelo o infecciones no virales (González-Garza, 2017). La ventaja es que se puede aplicar un diagnóstico inmediato,

no obstante, es recomendable confirmarlo con otro método serológico o molecular para obtener una mayor confiabilidad en los resultados (Naidu y Hughes, 2003).

Las plantas indicadoras son aquellas que son sensibles a virus específicos y en la inoculación con estos virus se desarrollan síntomas característicos y viceversa; es decir, el desarrollo de los síntomas característicos por un indicador identifica el virus con el que se inoculó este (Agrios, 2005). Este método es simple y de bajo costo, puede usarse en lugares de recursos limitados. La inoculación puede llevarse a cabo de forma mecánica frotando unas hojas maceradas de la planta enferma, sobre una planta indicadora que fue previamente tratada con un abrasivo, este método puede ser utilizado exclusivamente con los virus que se transmiten mecánicamente. Por ejemplo, *Chenopodium quinoa* es la planta indicada para detectar al virus de la mancha anular de la papaya (papaya ring spot virus, PRSV), ésta presenta síntomas a las 3 semanas de la inoculación (figura 13) (Kelaniyangoda y Madhubashini, 2010). La segunda opción es por injerto, éste método es muy utilizado con los virus que no se transmiten mecánicamente, por ejemplo en los cítricos; en particular el virus de la tristeza que es detectado mediante *Citrus aurantifolia* o lima mexicana (figura 14) (Roistacher, 1991); y como tercera opción están los vectores que transmiten los virus, como son los insectos áfidos, saltamontes, moscas blancas y trips (Agrios, 2005).



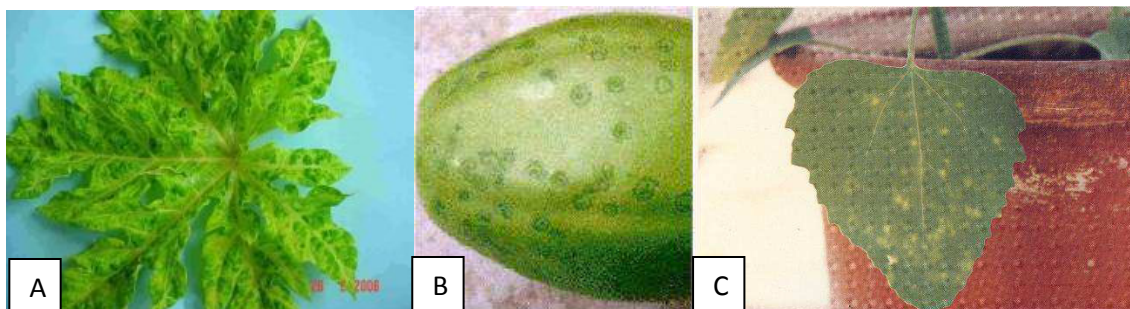


Figura 13. Síntomas del PRSV. A) Moteado y distorsión de hojas. B) Manchas en la superficie de la fruta. C) Planta indicadora *Chenopodium quinoa* con síntomas de PRSV (Kelaniyangoda y Madhubashini, 2010).

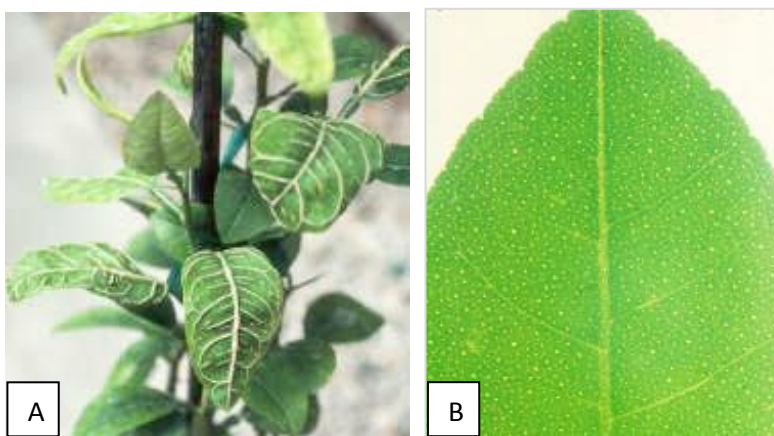


Figura 14. Síntomas asociados con el virus tristeza de los cítricos. A) Taponamiento de nervaduras en hojas de plántulas de lima mexicana inoculadas con un aislado severo de tristeza. B) Manchas leves con aclareamiento de nervaduras inducidas en una hoja de lima mexicana por un aislado de tristeza de reacción leve (Roistacher, 1991).

#### 2.4.2. Métodos serológicos: ELISA

Conforme fue avanzando la tecnología en métodos de diagnóstico, a finales de los setentas se desarrolló una técnica llamada Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Ensayo Inmunoabsorbente ligado a una enzima), o mejor conocida como ELISA. Para esto, previamente se inyecta un antígeno (en este caso el virus o bacteria) en la sangre

comúnmente de un mamífero (regularmente conejos), por consiguiente, el animal produce nuevas proteínas denominadas anticuerpos que solo reaccionan con ese virus o bacteria; después los anticuerpos son extraídos y purificados, y son los que se comercializan para la detección de estos patógenos previa conjugación de parte de dicho antisuero con una enzima, que normalmente es fosfatasa alcalina o peroxidasa. Primero se sensibiliza la placa con el antisuero de cobertura (antisuero sin la enzima), posteriormente se adiciona la muestra sospechosa de contener el patógeno, si el patógeno está presente, es capturado por el anticuerpo de cobertura y posteriormente se adiciona el anticuerpo conjugado con la enzima, si el patógeno está presente, éste se adhiere y cuando se adiciona el sustrato, la enzima conjugada con el anticuerpo, degrada el sustrato y éste cambia de color (Agrios, 2005) (figura 15).

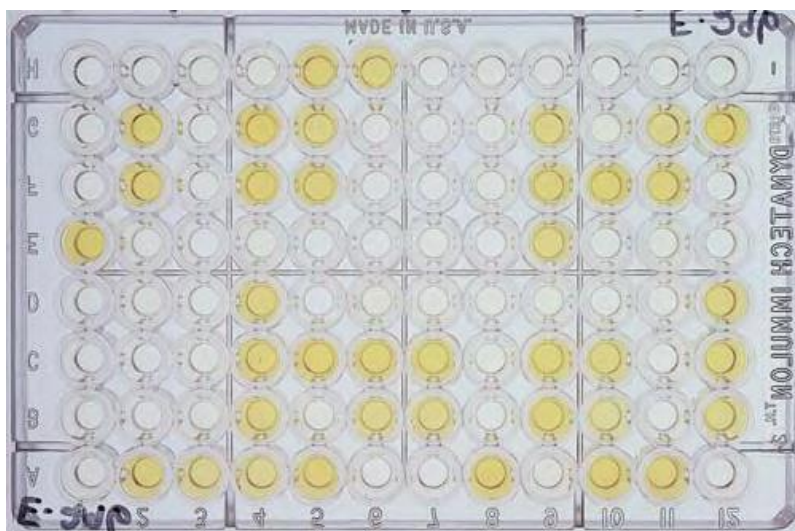


Figura 15. Prueba ELISA. Placa con cavidades, aquellas que se vuelven amarillas contienen el virus o bacteria contra el cual se produjo el antisuero cuando éste se conjugó con la enzima fosfatasa alcalina, en caso de conjugarse con la enzima peroxidasa, el color es púrpura (tomada de Agrios, 2005).

Actualmente la prueba ELISA es de las más usadas para el diagnóstico de los virus que infectan el género *Allium*. En el estado de Guanajuato en México, los estudios publicados hasta el momento han sido desarrollados mediante ELISA detectando los virus OYDV, LYSV, GarCLV y SLV en plantas (Pérez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010) y el virus IYSV en insectos (García-Rodríguez *et al.*, 2014). También en el estado de Zacatecas se utilizó ELISA y se detectaron los virus anteriores, pero además de TEV (Velásquez *et al.*, 2010). En Argentina se analizó el LYSV hasta en siete etapas del cultivo de ajo, observando sus distintas concentraciones mediante ELISA (Conci *et al.*, 2002).

Una de las empresas con mayor experiencia y variedad en productos de éste método es Agdia<sup>MR</sup>, el cual tiene en venta hasta 149 estuches (kits) para diferentes tipos de virus ([www.agdia.com](http://www.agdia.com)); sin embargo, esta cifra no alcanza la cantidad de virus patógenos que afectan a las plantas y se ha disminuido el uso de ELISA debido a algunas limitaciones, como la disponibilidad de antisueros para el virus objetivo, el costo para producir anticuerpos, el requisito de un gran volumen de muestra y el tiempo para completar el análisis.

Comparado con los otros métodos, el uso de los reactivos es de los más económicos, también es rápido y muy sensible pudiendo detectar concentraciones de 1 a 10 ng mL<sup>-1</sup>. La desventaja es que en algunos virus puede haber variación serológica y hace difícil la producción de antisueros específicos (Dovas *et al.*, 2001).

### **2.4.3. Métodos moleculares: RT-PCR**

En 1986 se desarrolló la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR , que se basa principalmente en la replicación de fragmentos de ADN a través de varios ciclos de temperaturas que facilitan la separación de las hebras y la síntesis de las cadenas complementarias de cada hebra según los iniciadores (primers) del microorganismo que se requiera detectar, de tal modo que, pueda amplificarse millones de veces y sea posible analizarlo mediante electroforesis sobre un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (González-Garza, 2017).

En comparación con el método de ELISA, la PCR es aún más rápida y más confiable al aumentar hasta  $10^4$  veces más en sensibilidad, otra ventaja es que se pueden diseñar primers específicos con un espectro de detección más amplio que el de los antisueros y también se logra reducir los riesgos de contaminación (Dovas *et al.*, 2001).

Cuando la infección en una planta es mixta, es decir, con dos virus o más presentes al mismo tiempo; es posible hacer la detección de forma múltiple. Esto ha sido aplicado para los virus OYDV, SLV, GarCLV y Allexivirus en el cultivo de ajo. Los resultados pueden expresarse en un gel de agarosa o por secuenciación de ADN. El método es muy utilizado a nivel mundial, pero puede llegar a limitarse por costos elevados (Majumder y Baranwal, 2014).

En la figura 16 se puede observar que esta técnica permite analizar los virus en forma individual o múltiple según sea aplicado.

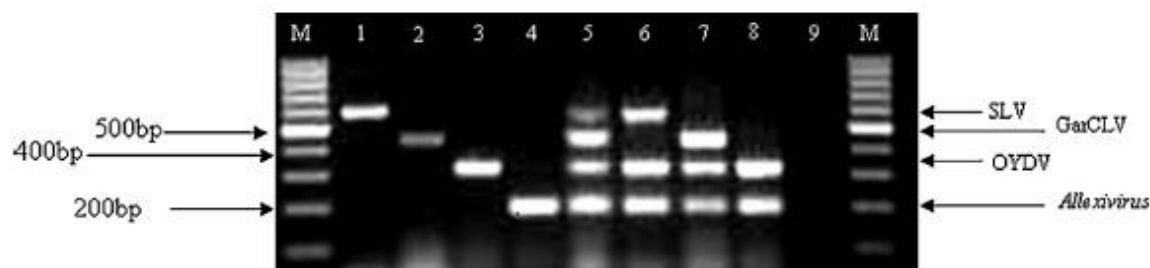


Figura 16. Detección simultánea de OYDV, SLV, GarCLV y Allxivirus en ajo, por RT-PCR múltiple. Carril M: Marcador 100 bp. Carriles 1 al 4: controles positivos de SLV, GarCLV, OYDV y Allxivirus. Carriles 5 al 8: muestras positivas. Carril 9: Control negativo (tomado de Majumder y Baranwal, 2014).

## 2.5. Formas de transmisión

Una vez que el virus ha infectado una planta ya queda permanente en ella y puede transmitirse a otras plantas mediante diversas formas como: la propagación vegetativa, mecánicamente a través de la savia y por medio de semillas, polen, insectos, ácaros, nematodos, plantas parásitas como la cúscuta y hongos (Agrios, 2005).

### 2.5.1. Propagación vegetativa

Una vez que la planta madre haya adquirido un virus y ésta sea reproducida de forma vegetativa a través de injertos, esquejes o por uso de tubérculos, cormos o

bulbos, es muy seguro que se puedan transmitir a la progenie (Agrios, 2005). La forma generalizada de propagación del ajo es por medio de los bulbillos o “dientes” porque garantizan mucho mejor la brotación, debido a que mantienen a la plántula durante momentos más críticos de su crecimiento (figura 17). Otra modalidad puede ser por semilla, pero la desventaja es que rara vez es fértil y es más usada para mejora genética a través de cruzamientos (García-Alonso, 1998).



Figura 17. Propagación vegetativa del ajo. A) Bulbillos seleccionados para siembra, B) Bulbillos colocados en los surcos, C) Brotación de una nueva planta a partir del bulbillo.

Los virus más comunes que pueden transmitirse de forma vegetativa en ajo son OYDV, LYSV, GLV, GarCLV, SLV, IYSV, SYSV, TEV y Allexivirus (Hu *et al.*, 2015; Majumder y Baranwal, 2014; Nam *et al.*, 2015; Uga and Tsuda, 2004).

### 2.5.2. Vectores

Otro medio común de transmisión de virus en los ajos es a través de insectos y ácaros, éstos contienen aparatos bucales que perforan y succionan o mastican, que al introducirse en la savia de las plantas cuando se alimentan es donde pueden adquirir los virus y a su vez pueden transferirlos a otras plantas.

Hay insectos que pueden contener virus no persistentes, que sólo se localizan en sus partes bucales, como los estiletes; o virus persistentes que son lo que se acumulan dentro de su soma. Los áfidos son los insectos económicamente más perjudiciales y son los que transmiten la mayoría de los virus (Agrios, 2005).

Los trips son los transmisores del género Tospovirus, hasta ahora se han encontrado 10 especies que tienen la capacidad para portar 16 virus diferentes (Pappu *et al.*, 2009). El ajo es susceptible a infestaciones de trips (figura 18), los cuales transmiten el IYSV, éstos lo adquieren en la etapa larvaria y la transmisión se produce por larvas de segundo estadio y trips adultos en forma propagativa y persistente (Inoue *et al.*, 2010).



Figura 18. Adulto de *Thrips tabaci* L. (Bag *et al.*, 2015).

Los ácaros que pertenecen a la familia Eriophyidae, pueden transmitir virus; otros virus son transmitidos por ácaros del género *Brevipalpus* que trasmite la Leprosis de los cítricos. Cada uno de los ácaros suelen ser más específicos al tener un rango de hospederos más limitado, y ser el único vector conocido del o los virus que transmite (Agrios, 2005).



El virus filamentososo transmitido por ácaros del ajo (GarMbFV) es transmitido por *Aceria tulipae* (figura 19) en la etapa de ninfas de segundo estadio y adultos. Las plantas de ajo muestran síntomas leves de mosaico aproximadamente dos meses después de la inoculación (Yamashita *et al.*, 1996). Los ácaros se alimentan de células turgentes ya que dependen de la presión contenida, por lo que, al perforarla el alimento sube por capilaridad a través de sus estiletes (Westphal y Manson, 1996).

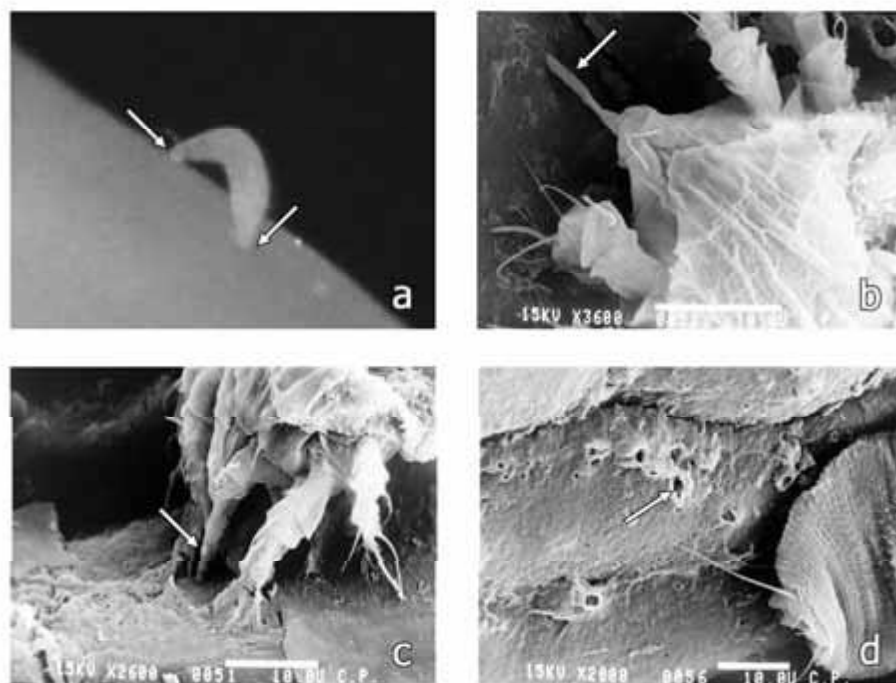


Figura 19. Alimentación en *Aceria tulipae*. a) Forma en que alimenta, b) Detalle de los estiletes, c) Estiletes en posición para penetrar el sustrato, d) Daños causados al tejido por la alimentación (tomado de Acuña-Soto *et al.*, 2012)



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización de los experimentos y muestreo de plantas

El muestreo de plantas se realizó en el cultivo de ajo del Campo Experimental de la Unidad Académica la Ascensión de la FAUANL, ubicado en el municipio de Aramberri, Nuevo León durante los ciclos agrícolas 2016/2017 y 2017/2018. Las coordenadas geográficas del lote son 24°19'12.28" N 99°56'35.68" O a una altitud de 1,960 msnm (figura 20).



Figura 20. Ubicación del municipio de Aramberri, Nuevo León donde se llevaron a cabo los muestreos de los ciclos otoño-invierno 2016/2017 y 2017/2018.

Durante el ciclo agrícola otoño-invierno 2016/2017, a los 190 días después de la siembra, se recolectaron 20 muestras representativas de cuatro variedades de ajo para su análisis: Tigre, Fermín, California y Criollo La Trina. El área de muestreo

consistió en un surco de 100 metros por cada variedad, y se seleccionaron plantas aleatoriamente (figura 21).



Figura 21. Muestras recolectadas para su análisis. En grupos de 5 plantas de izquierda a derecha: Tigre, Fermín, California y Criollo La Trina (26 de abril del 2017).

El ciclo agrícola 2017/2018, la siembra fue realizada el 18 de octubre del 2017. Se recolectaron 54 muestras de 3 variedades de ajo: Fermín, Tigre y California. Estas 54 muestras fueron recolectadas en 3 etapas fenológicas, 9 al momento de la siembra (0 días después de la siembra, dds), 15 a los 100 dds y 30 muestras a los 200 dds. En el primer muestreo se seleccionaron bulbos representativos, de los cuales a su vez se tomaron tres bulbillos de cada variedad para el análisis viral de la semilla que se utilizó para la siembra. El segundo muestreo se hizo a los 100 dds cuando las plantas se encontraban en una etapa de 4 a 5 hojas promedio, se colectaron de forma aleatoria 15 muestras (5 hojas de 5 plantas de cada variedad). El tercer muestreo se hizo a los 200 dds y consistió en extraer de forma aleatoria 10 plantas completas de cada variedad.

Las muestras se colocaron en bolsas de papel y se trasladaron al laboratorio de Fitopatología de la FAUANL. Los análisis de las muestras se desarrollaron en los laboratorios Biociencia ubicado en Monterrey y Fitopatología en Gral. Escobedo, ambos municipios en el estado de Nuevo León.

### **3.2. Análisis de las muestras vegetales**

En el ciclo 2016/2017 se analizó una muestra compuesta de 5 plantas por cada variedad utilizando las técnicas ELISA y RT-PCR, en cambio durante el ciclo 2017/2018, 54 muestras fueron analizadas en forma individual utilizando la técnica RT-PCR.

#### **3.2.1. ELISA**

Para la determinación de los virus OYDV, LYSV, GarCLV, IYSV, TEV y SLV mediante la técnica ELISA, se utilizaron los antisueros y procedimientos de la compañía Agdia Inc. (Elkhart, IN, EE.UU.); en el caso de los primeros cinco virus, los antisueros se conjugaron con la enzima fosfatasa alcalina, mientras que el SLV se conjugó con la enzima peroxidasa. Se utilizaron controles positivos y negativos también de la compañía Agdia Inc. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro BIORAD Modelo 3550-UV, leyendo a una longitud de onda de 405 nm para LYSV, OYDV, GCLV, IYSV y TEV, a 655 nm para el virus SLV. Las lecturas de cada muestra se hicieron por duplicado y el valor promedio de cada par fue

registrado. El criterio para determinar las muestras positivas fue cuando el doble del valor promedio de absorbancia del control negativo fuera superado (R. González, comunicación personal).

### **3.2.2. RT-PCR y secuenciación de ADN**

Para la identificación de los virus por la técnica RT-PCR todas las muestras fueron analizadas individualmente para los virus SLV, LYSV, GCLV, Allexi, OYDV y TEV siguiendo los protocolos modificados de Majumder y Baranwal (2014), Nam *et al.* (2015) y Dai *et al.* (2012).

**3.2.2.1. Extracción de ARN.** Primero se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) a partir de 50-100 mg de tejido vegetal de los bulbillos, en el caso de la semilla para siembra, y de hojas para el caso del muestreo de campo, utilizando el método del Trizol<sup>MR</sup> (Molecular Research Center, Inc.). El proceso consistió en macerar las muestras y homogenizarlas con 0.9 mL de TRI Reagent agitando en vortex y dejando reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 0.2 mL de cloroformo mezclando vigorosamente durante 15 seg aproximadamente, y dejando reposar 5 min. Después de centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) a un nuevo tubo, y enseguida se mezcló con un volumen de isopropanol mezclando por inversión y dejando reposar otros 5 min para precipitar el ARN. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 8 min y luego se decantó. Se lavó la pastilla de ARN con 0.5 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 x g durante 5 min y se volvió a decantar. Se secó la pastilla de ARN en posición invertida en una

sanita estéril durante 5 min aproximadamente y se resuspendió en 30 µL de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) incubando a 55°C por 10 minutos. Posteriormente se realizó una determinación de la concentración del ARN utilizando un Nanodrop<sup>MR</sup>.

**3.2.2.2. Reacciones de RT-PCR.** Se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) de los virus mediante reacciones de reverso transcripción (RT), seguido por la amplificación del ADNc mediante la técnica PCR.

Las reacciones de RT se realizaron utilizando una mezcla de reacción que contenía 4 µL de ARN de la muestra, 2 µL de buffer MMLV 5x, 2 µL de una mezcla de dNTP's a una concentración de 2.5 mM, 0.125 µL de RNasin a una concentración de 40 U/ µL, 0.5 µL de la enzima M-MLV (Promega<sup>MR</sup>) a una concentración de 200 U/µL, y los primers reversos (Cuadro 5). Una mezcla de reacción contenía 0.4 µL de cada uno cinco primers: SL-C10, LYS-C15, GCL-C40, AL-C30 y OYD-C06 (Nam *et al.*, 2015); otra mezcla de reacción sólo contenía un primer de TEV-R con la cantidad de 2 µL; todos a partir de un stock a una concentración de 10 µM (Cuadro 4). Enseguida se incubó a 42°C durante 1 hora y luego se calentó a 94°C por 2 minutos para desnaturalizar a la enzima.

Cuadro 4. Primers usados en las pruebas de RT-PCR para la amplificación de virus en ajo (Nam *et al.*, 2015, Dai *et al.*, 2012).

Virus	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)
SLV	SL-N30	TATGGCTAACGAAGAAGAAGAACTC	203
	SL-C10	CGTTCACGCTAGACAATTCAGACAT	
LYSV	LYS-N10	CGCATATGCAGTGATGTTTCGGTT	316
	LYS-C15	ATCAAATTCAGGCTGCTTATACAC	
GCLV	GCL-N30	GCACCAGTGGTTTGGGAATGA	481
	GCL-C40	AGCACTCCTAGAACAACCATTA	
Allexi-virus	AL-N30	CAYTCHATGAAYGCBAARATGTC	281
	AL-C30	GGCTTATTYTGWCTAGYYTTACG	
OYDV	OYD-N25	CACCNTAYATAGCRGARACAGCTCT	602
	OYD-C06	ACTGAAATGCGCCATTATYTGCTA	
TEV	TEVF	TGATGGATGGTGAGGAG	347
	TEVR	GTGCCGTTTCAGTGTCTT	

Para las reacciones de PCR se utilizaron dos modalidades, la individual para la detección de un virus, y la múltiple para detección simultánea de cinco virus en la misma prueba, en ambos casos el volumen final fue de 25  $\mu$ L. La prueba individual fue la de TEV donde se siguió el protocolo de Dai *et al.* (2012) modificado; se hizo una mezcla con 3  $\mu$ L de ADNc, 5  $\mu$ L de buffer de PCR 5X, 2.4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  a una concentración de 25 mM, 2.8  $\mu$ L de dNTP's a una concentración de 2.5 mM, 0.2  $\mu$ L de enzima go-Taq a una concentración de 5 U/ $\mu$ L (Promega<sup>MR</sup>), y 2  $\mu$ L de los primer TEV-R y TEV-F a 10 $\mu$ M . Las muestras fueron colocadas en un termociclador (Thermo<sup>MR</sup>), con un programa térmico que consiste en un ciclo de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 48°C por 30 s y 72 °C durante 60 s, y un paso de extensión final a 72°C por 5 min.

Para el caso de los otros virus del ajo, se siguió el procedimiento de Nam *et al.* (2015) modificado que es un RT-PCR múltiple con reacciones de 25 µL donde se dividieron los componentes en dos mezclas. La primera mezcla contenía 2 µL de cada primer para tres virus: SL-N30/SL-C10, LYS-N10/LYS-C15, GCL-N30/GCL-C40; la segunda mezcla incluye 2 µL de cada primer de dos virus: AL-N30/AL-C30, OYD-N25/OYD-C06 (Cuadro 5). Adicionalmente a cada mezcla se agregaron 3 µL de ADNc, 5 µL de buffer de PCR 5X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 25 mM, 2 µL de dNTP's a una concentración de 2.5 mM y 0.2 µL de enzima go-Taq a una concentración de 5 U/µL (Promega). El programa térmico para la PCR múltiple es iniciado por un ciclo de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 15 s, 54°C por 30 s y 72 °C durante 20 s, y un paso de extensión final a 72°C por 6 min.

**3.2.2.3. Electroforesis en geles de agarosa y secuenciación de ADN.** Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en función de su tamaño y carga eléctrica y se visualizaron en un gel de agarosa al 1% aplicando una corriente eléctrica de 60 volts durante 5 minutos y la cual se incrementó a 100 volts hasta que el colorante avanzó 2/3 partes del gel. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV (UV modelo M-26) ya que los geles fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL y se documentaron los resultados en fotografías.

Los productos de PCR de muestras representativas de los virus detectados fueron secuenciadas en la compañía Macrogen (EE.UU.) y comparadas con la base de datos del GenBank para su corroboración a nivel de especie.

### **3.3. Muestreo y análisis de trips**

Durante el ciclo agrícola 2017/2018 se realizó un muestreo de trips a los 162 dd en una plantación de ajo, con una extensión de 1 ha ubicada en el municipio de Aramberri, Nuevo León con las coordenadas geográficas 24°19'12.28" N, 99°56'35.68" O a una altitud de 1,977 msnm; la cual fue sembrada el 18 de octubre usando las variedades Tigre y Fermín. Se utilizó la metodología de muestreo de "cinco deoros" la cual consistió en localizar cinco puntos de muestreo dentro de la plantación, uno al centro y los cuatro restantes en las esquinas del predio. Cabe mencionar que las plantas se mostraron con menos vigor debido a la ocurrencia de heladas tempranas. En cada punto de muestreo se eligieron cinco plantas, para un total de 25 plantas muestreadas (colectadas) las cuales se colocaron en bolsas de polietileno con cierre hermético, que fueron etiquetados y trasladadas dentro de una hielera al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la UANL. Las plantas se utilizaron para identificar y cuantificar los trips así como detectar la presencia del virus IYSV.

#### **3.3.1. Montaje e identificación de trips**

Se realizó una revisión minuciosa de las muestras bajo el microscopio estereoscopio para colectar y contabilizar los trips usando para ello un pincel fino (No. 000) los especímenes encontrados fueron colocados en un frasco con alcohol etílico al 70 %.



Para la identificación taxonómica de los trips se realizaron montajes en portaobjetos usando la técnica de Mound y Kibby (1998) modificada, la cual consiste en un aclaramiento de los especímenes en ácido láctico durante 10 min a 60 °C, posteriormente se montaron en glicerina y se colocaron a 40 °C durante 5 días en una estufa (Lab Companion modelo IB-01E). Posteriormente se observaron bajo un microscopio (Labomed USA) comparando las secciones del insecto con las claves taxonómicas de Metcalf y Flint (1962), y Triplehorn y Johnson (2005) para determinar el género de los especímenes.

### **3.3.2. Diagnóstico del IYSV**

El diagnóstico del virus IYSV tanto en plantas como en insectos se realizó utilizando la técnica RT-PCR, siguiendo el protocolo de Uga y Tsuda (2005) modificado. Primero se extrajo el ARN a partir de 50 mg de tejido vegetal de las hojas y una muestra compuesta de trips (pool), utilizando el método de Trizol<sup>MR</sup> (Molecular Research Center, Inc.). Después se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante reacciones de reverso transcripción (RT) seguido por la amplificación del ADNc mediante la técnica PCR. Los iniciadores utilizados fueron: IYSV-459 (5'-ACCAGAGGAAGCCCGCAG-3') y TOS-R15 (5'-GGGAGAGCAATYGWGKYR-3') esperando un producto final de 459 pares de bases.

Las reacciones de RT se realizaron utilizando una mezcla de reacción con 3 µL de ARN de la muestra, 2 µL de buffer MMLV, 2 µL de dNTP's a una concentración de

2.5 mM, 0.125  $\mu$ L de RNasin, 0.5  $\mu$ L de la enzima M-MLV (Promega<sup>MR</sup>) a una concentración de 200 U/ $\mu$ L, 1.375  $\mu$ L de agua grado Mili-Q, y 1.5  $\mu$ L del primer TOS-R15 a partir de un stock a una concentración de 10  $\mu$ M. Enseguida se incubó a 42°C durante 1 hora y luego se calentó a 94°C por 2 minutos para inactivar la enzima.

Para las reacciones de PCR se hizo una mezcla con 3  $\mu$ L de ADNc, 5  $\mu$ L de buffer de PCR 5X, 2  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25 mM), 2  $\mu$ L de dNTP's a (2.5 mM), 0.2  $\mu$ L de enzima go-Taq (5 U/ $\mu$ L) (Promega<sup>MR</sup>), se usaron los iniciadores IYSV y TOS-R15 (2  $\mu$ L de cada uno) (Cuadro 1). La PCR consistió de un ciclo de desnaturalización a 94°C por 1 minutos, seguido de 35 ciclos con desnaturalización a 94°C por 30 s, 50°C por 30 s y elongación a 72 °C durante 60 s, y un paso de elongación final a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en función de su tamaño y carga eléctrica y se visualizaron en un gel de agarosa al 1% igual que en los casos anteriores. Los geles se observaron en un transiluminador de luz UV y se documentaron los resultados en fotografías.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Ciclo 2016/2017

De acuerdo con el método ELISA, las muestras analizadas de la cosecha del ciclo agrícola 2016/2017 mismas que fueron utilizadas en la siembra del ciclo 2017/2018, dieron resultados negativos en las cuatro variedades para los virus OYDV, LYSV, GarCLV, IYSV, SLV; en cambio para TEV solo fue positiva la variedad California (figura 22).

A)

Diagrama de muestras en placa de ELISA

Fecha: 08/05/2017 Prueba o diagnóstico: Screening de ajo

		OYDV		LYSV		GarCLV		IYSV		TEV	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestras de Variedad Tigre → A		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Muestras de Variedad Fermin → B		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Muestras de Variedad California → C		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Muestras de Variedad Criollo → D		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Control Positivo → E		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control Negativo → F		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blanco → G		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

B)

Resultados de muestras en placa de ELISA										
Fecha: <u>08/05/2017</u> Prueba o diagnóstico: <u>Screening de ajo</u> Lectura: <u>405 nm</u>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.077	0.077	0.059	0.064	0.287	0.260	0.083	0.078	0.076	0.077
B	0.069	0.073	0.056	0.059	0.237	0.237	0.071	0.060	0.086	0.086
C	0.153	0.116	0.081	0.094	0.268	0.243	0.073	0.064	0.209	0.241
D	0.079	0.076	0.056	0.064	0.276	0.273	0.082	0.063	0.053	0.056
E	OVER	OVER	3.187	2.850	2.445	2.485	1.577	1.325	2.517	2.344
F	0.072	0.068	0.059	0.064	0.282	0.274	0.077	0.075	0.053	0.051
G	0.045	0.047	0.050	0.059	0.055	0.048	0.057	0.046	0.046	0.046

C)

## Diagrama de muestras en placa de ELISA

Fecha: 08/05/2017

Prueba o diagnóstico: Screening de ajo

SLV

1 2

Muestras de Variedad Tigre	→	A	1	1
Muestras de Variedad Fermin	→	B	2	2
Muestras de Variedad California	→	C	3	3
Muestras de Variedad Criollo	→	D	4	4
Control Positivo	→	E	+	+
Control Negativo	→	F	-	-
Blanco	→	G	B	B

## Resultados de muestras en placa de ELISA

Fecha: 08/05/2017

Prueba: Screening de ajo

Lectura: 655 nm

	1	2
A	0.053	0.053
B	0.051	0.052
C	0.053	0.052
D	0.049	0.049
E	0.425	0.428
F	0.048	0.050
G	0.044	0.047

Las mismas muestras analizadas por ELISA fueron realizadas mediante RT-PCR con resultados diferentes. Los Alexivirus se presentaron en las cuatro variedades, OYDV sólo en Criollo La Trina, SLV en Tigre y Fermín, TEV en Tigre, Fermín y California; y para GarCLV y LYSV resultaron negativos en las cuatro variedades (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados del análisis de muestras por RT-PCR durante el ciclo 2016/2017.

Virus	Variedades			
	Tigre	Fermín	California	Criollo La Trina
Allexi	+	+	+	+
OYDV	-	-	-	+
GarCLV	-	-	-	-
SLV	+	+	-	-
TEV	+	+	+	-
LYSV	-	-	-	-

De acuerdo con lo anterior, son evidentes las diferencias en precisión y sensibilidad de ambos métodos de diagnóstico; esto confirma los comentarios publicados por Lunello *et al.* (2005) y Berniak *et al.* (2009), quienes hacen referencia que la sensibilidad del RT-PCR en la detección de virus es 102 veces mayor que la prueba DAS-ELISA. Actualmente la RT-PCR casi no se utiliza para diagnóstico de virus en ajo en México, posiblemente debido a sus mayores costos, sin embargo, debe aplicarse debido a los falsos negativos que arroja la prueba de ELISA. En este caso particular, los resultados de ELISA nos permitieron tomar la decisión de analizar las muestras del siguiente ciclo por RT-PCR.

## 4.2. Ciclo 2017/2018

Con relación al ciclo 2017/2018, las 54 muestras analizadas por RT-PCR revelaron la presencia de dos a cinco virus en cada planta, teniendo una tasa de coinfección del 100%. Dos muestras (3.7%) contenían 2 virus, seis muestras (11.11%) contenían 3 virus, diez muestras (18.52%) contenían 4 virus y, treinta y seis muestras (66.67%) contenían 5 virus (figura 23). Las variedades Tigre y Fermín mostraron mayor frecuencia de virus que la variedad California. Los virus encontrados en cada una de las variedades se muestran en la figura 24.

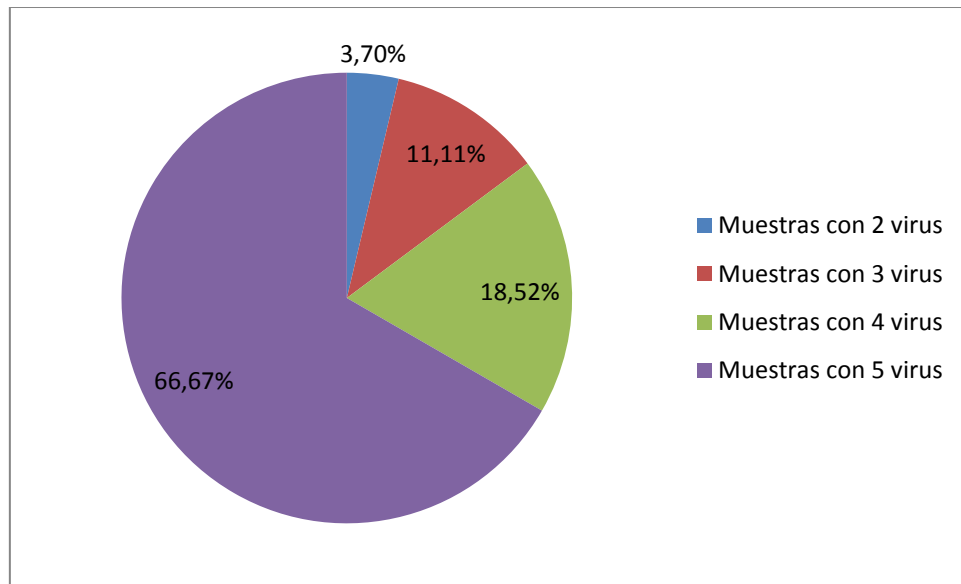


Figura 23. Tasa de coinfección de virus en muestras de ajo analizadas.

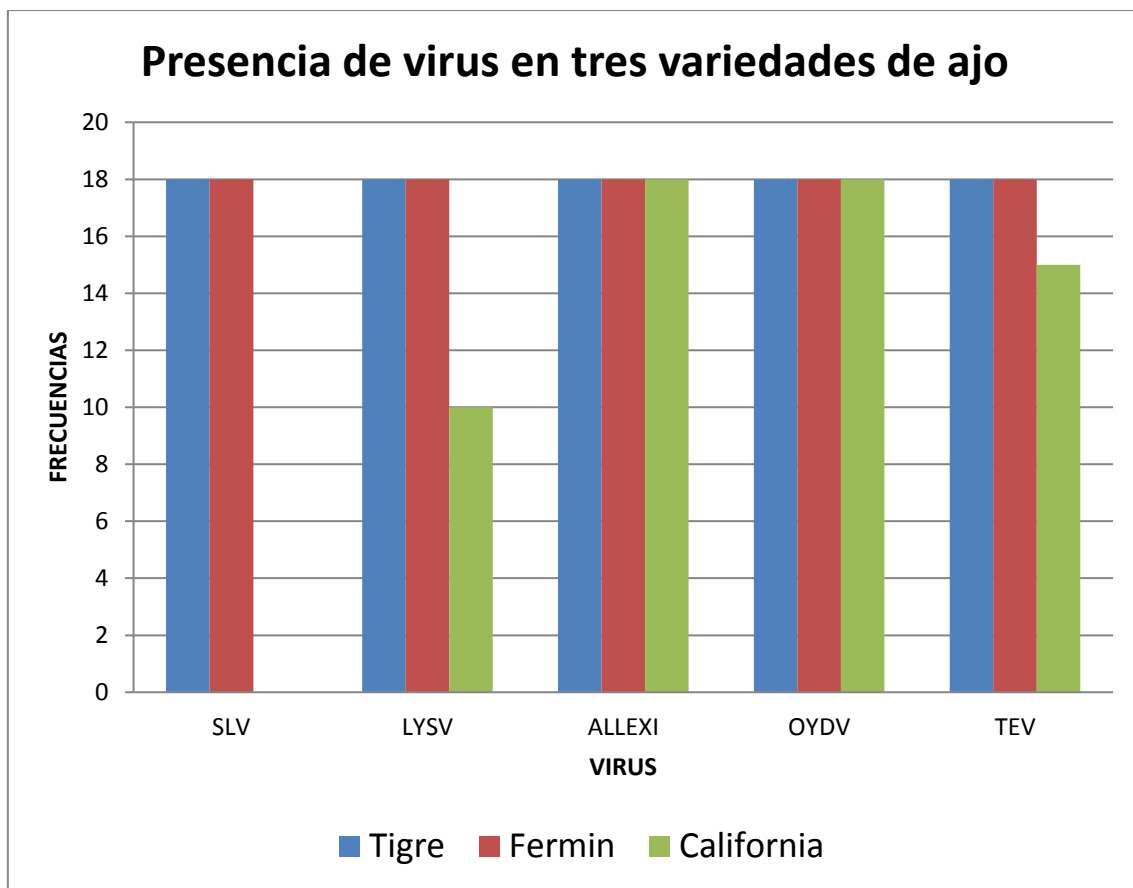


Figura 24. Resultados obtenidos del análisis de 54 muestras de ajo por RT-PCR durante el ciclo 2017/2018.

Lo anterior confirma la simultaneidad en la que pueden manifestarse los virus en una misma planta tal como lo mencionan Lot *et al.* (1998), Conci *et al.* (2003) y Cafrune *et al.* (2006) en sus investigaciones de campo.

Los resultados obtenidos en las semillas (bulbillos) sobre presencia de múltiples virus, hacen suponer que tal vez todo el bulbo contenga virus tal como lo demostró Conci *et al.* (2010).

Los virus que se encontraron en un 100% de las plantas analizadas fueron del género *Allexivirus* y el OYDV, y el de menor presencia fue SLV con 66.7% (figura 25). Cabe mencionar que TEV no ha sido reportado hasta el momento en otros países en el cultivo de ajo, sólo ha sido detectado en el estado de Zacatecas mediante la técnica DAS-ELISA (Velasquez *et al.*, 2010), y en la presente investigación se detectó el virus por ELISA y por RT-PCR, y se corroboró por secuenciación de ADN encontrando una incidencia del 94.4% en el área de estudio (figura 26). En México se han reportado los virus LYSV, SLV, TEV, OYDV y GarCLV (Pérez *et al.*, 2007 y 2008; Velásquez *et al.*, 2010) pero en el caso del *Allexivirus*, este es el primer reporte conocido hasta el momento y por lo tanto se desconoce su daño potencial.

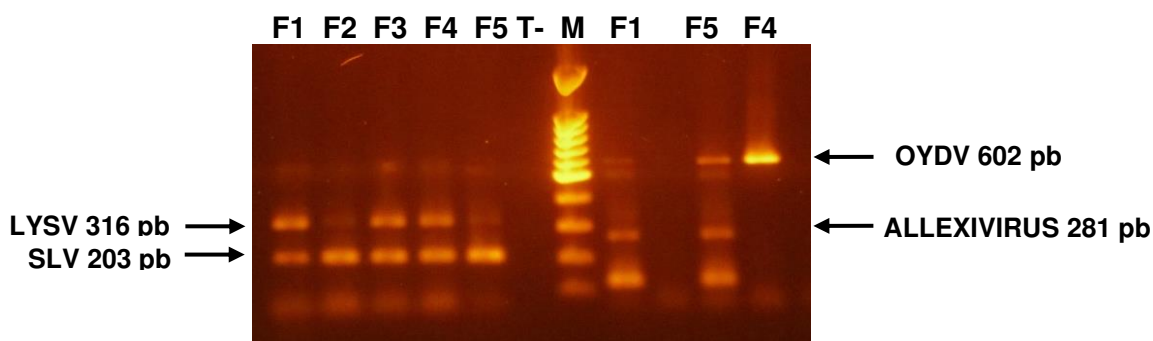


Figura 25. Resultados de RT-PCR múltiple para diferentes virus del ajo durante el ciclo 2017/2018. M=marcador de peso molecular, F1, F2, F3, F4 y F5 muestras problema, T- control negativo.

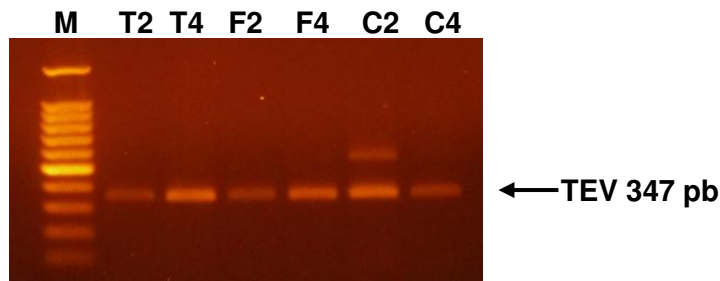


Figura 26. Resultados de RT-PCR para el virus TEV. M=marcador de peso molecular, T2, T4, F2, F4, C2 y C4 muestras problema de las variedades Tigre, Fermín y California (T, F y C).



Por otra parte, se observó un comportamiento similar en las variedades Tigre y Fermín con los 5 virus encontrados en los tres muestreos, sin embargo, la variedad California mostró ausencia del SLV, y el resto de los virus se presentaron en forma heterogénea entre los tres muestreos lo cual puede deberse a que el cultivo puede presentar diferentes niveles de concentración de los virus según la variedad, etapa y tipo de tejido (Conci *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2008 y 2010). Respecto al virus GarCLV, no fue detectado en ninguna de las muestras.

Con respecto al resultado de la secuenciación de los productos de PCR de OYDV y SLV, las secuencias obtenidas al ser comparadas con las secuencias en el GenBank arrojaron una similitud del 98 y 97 % respectivamente con accesiones de China y Korea. En el caso de las muestras positivas a Allexivirus, la comparación de secuencias permitió la identificación del aislamiento como GarV-D con una similitud del 94% (figura 27).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Japanese garlic virus (UK garlic isolate) genomic RNA, 3' clip	228	228	27%	1e-55	94%	<a href="#">L38892.1</a>
Garlic virus D coat protein (ORF-V) and 15 kDa protein (ORF-VI) genes, complete cds	224	224	26%	1e-54	94%	<a href="#">AF519572.1</a>
Garlic virus D isolate Mesi 13, complete genome	210	210	27%	3e-50	91%	<a href="#">KR819505.1</a>
Garlic virus D isolate GarVD-SW9, complete genome	210	210	27%	3e-50	91%	<a href="#">KF550407.1</a>
Garlic virus D isolate Bate1 TGB1 gene, partial cds, and TGB2, 40 kDa protein, coat protein, and NABP genes, complete cds	210	210	27%	3e-50	91%	<a href="#">JN019815.1</a>
Garlic virus D nucleic acid binding protein gene, partial cds	208	208	27%	1e-49	91%	<a href="#">F3643476.1</a>
Garlic virus D isolate GarVD-SW10, complete genome	205	205	27%	1e-48	91%	<a href="#">KF555653.1</a>
Garlic virus D genomic RNA, 3' portion, partial sequence	205	205	27%	1e-48	91%	<a href="#">AB010303.1</a>
Garlic virus E complete genomic RNA, isolate YH	187	187	27%	4e-43	88%	<a href="#">AJ292230.1</a>
Garlic virus D clone CV3-900 capsid protein and nucleic acid binding protein genes, partial cds	165	165	27%	1e-36	85%	<a href="#">KR534889.1</a>
Garlic virus A isolate GarVA-SP, complete genome	165	165	26%	1e-36	85%	<a href="#">KF632716.1</a>
Garlic virus A isolate WA6, partial genome	165	165	26%	1e-36	85%	<a href="#">JX997951.1</a>
Garlic virus A isolate Bate1 replicase (RdRp) gene, partial cds, and triple gene block 1, triple gene block 2, 40 kDa protein, coat protein, and NABP genes, complete cds	154	154	26%	2e-33	84%	<a href="#">JN019812.1</a>
Garlic virus A isolate Bate1 replicase (RdRp) gene, partial cds, and triple gene block 1, triple gene block 2, 40 kDa protein, coat protein, and NABP genes, complete cds	150	150	27%	3e-32	82%	<a href="#">JX240755.1</a>

Figura 27. Comparación con secuencias del GenBank de las secuencias obtenidas de productos de RT-PCR del virus GarV-D en muestras de ajo de Aramberri, N.L.

#### 4.3. Incidencia de trips y del virus IYSV

Con respecto a las observaciones de los trips, fue posible recolectar 544 insectos en todas las plantas muestreadas, 56% corresponde a adultos y 44% a ninfas (figura 28). De los adultos, el 95% corresponden al género *Thrips spp.*, y 5% a *Frankliniella spp.* Ambos géneros presentan un cuerpo alargado, miden de 1 a 2 mm, las pupas no presentan alas mientras que los adultos si las presentan, el color varía del color amarillo a café; la diferencia entre los dos géneros es que los *Thrips spp.* presentan unas setas grandes en la parte posterior del protórax, y las especies de *Frankliniella spp.* presentan unas setas notorias en la parte anterior y posterior del protórax.

Lo anterior demuestra una alta incidencia de trips ya que el 100% de las plantas contaba con la presencia de estos insectos. En promedio había 22 especímenes por planta, con un intervalo desde 4 hasta 58 individuos en cada planta. Cabe mencionar la capacidad de sobrevivencia de estos individuos a las bajas temperaturas, ya que previo a la colecta se reportaron temperaturas de hasta -15°C.



Figura 28. Observación de un espécimen de *Thrips sp.* al microscopio compuesto.

Los resultados del análisis por RT-PCR tanto en hojas de ajo como en los trips dieron negativos para el virus IYSV, lo cual podría atribuirse a que la parcela de estudio no tenía en sus alrededores cultivos de cebolla ni tomate, que son los hospederos más susceptibles al IYSV.

## **5. CONCLUSIONES**

En el municipio de Aramberri, Nuevo León, durante los ciclos 2016/2017 y 2017/2018 se identificaron 5 especies de virus en el cultivo de ajo.

En el ciclo 2016/2017 se detectó en las variedades Tigre y Fermín la presencia de los virus: SLV (Shallot latent virus), TEV (Tobacco etch virus) y GarV-D (Garlic virus D); en la variedad California, TEV y GarV-D; y en la variedad criollo La Trina: OYDV (Onion yellow dwarf virus) y GarV-D.

En el ciclo 2017/2018 que abarcó del 18 de octubre del 2017 al 6 de mayo del 2018, las variedades Fermín y Tigre presentaron una incidencia del 100% para los virus: GarV-D, SLV, LYSV (Leek yellow stripe virus), OYDV y TEV. La variedad California presentó una incidencia de 100% del virus OYDV; 50% de LYSV y 88% de TEV.

Se presentó una tasa de coinfección de virus del 100%, los cuales estuvieron presentes desde la siembra hasta la cosecha, en las variedades Tigre, Fermín, California y Criollo La Trina.

El virus GarCLV, no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas.

En el ciclo agrícola 2017/2018, se encontraron especímenes del género *Thrips* spp. en el 100% de las plantas muestreadas y con un promedio de 22 especímenes por planta, pero ni las plantas ni los insectos eran portadores del IYSV.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Soto, J. A.; Estrada-Venegas, E. G.; Equihua-Martínez, A. y Valdez-Carrasco J. (2012). Ciclo biológico y observaciones del comportamiento de *Aceria tulipae* (Acari: Eriophyidae) bajo condiciones de laboratorio. *Revista Ibérica de Aracnología* 20, 129-141.
- Agdia. (2019). Agdia Testing Services. Información disponible en línea: <https://orders.agdia.com/pathogen-tests/elisa>. Fecha de consulta 26 de febrero de 2019.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press. USA. pp. 724-752.
- Bag, S.; Schwartz, H. F.; Cramer, C. S.; Havey, M. J. and Pappu, H. R. (2015). Iris yellow spot virus (Tospovirus: Bunyaviridae): from obscurity to research priority. *Molecular Plant Pathology* 16(3), 224–237.
- Berniak, H.; Malinowski, T. and Kaminska, M. (2009). Comparison of ELISA and RT-PCR assays for detection and identification of cucumber mosaic virus (CMV) isolates infecting horticultural crops in Poland. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 17(2), 5-20.
- Cafrune E. E., Perotto M. C., and Conci V. C. (2006). Effect of two Allexivirus isolates on garlic yield. *Plant Dis.* 90, 898-904.
- Celli, M. G., Perotto, M. C., Buraschi, D. and Conci, V. C. (2016). Biological and molecular characterization of Garlic virus D and its effects on yields of garlic. *Acta Hortic.* 1143, 193-200.
- Conci, V. C., Canavelli, A., Lunello, P., Di Rienzo, J., Nome, S. F., Zumelzu, G., and Italia, R. (2003). Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Dis.* 87, 1411-1415.

- Conci V. C, Canavelli A. E., and Balzarini M. G. (2010). The distribution of garlic viruses in leaves and bulbs during the first year of infection. *J Phytopathol.* 158,186–193.
- Dai J., Cheng J., Huang T., Zheng X., Wua Y. (2012). A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of five tobacco viruses in tobacco plants. *Journal of Virological Methods* 183, 57– 62.
- Dovas C. I., Hatziloukas E., Salomon R., Barg E., Shibolet Y., and Katis N. I. (2001). Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp. *Journal of Phytopathology* 149, 731–737.
- FAOSTAT. (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. Información disponible en línea: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Fecha de consulta 14 de marzo de 2017.
- García-Alonso C. R. (1998). *El Ajo Cultivo y Aprovechamiento*. Editorial Mundi-Prensa. 18-38 pp.
- García-Rodríguez, O. G., Pérez-Moreno, L., Navarro-León, M. J., Salas-Araiza, M. D., Martínez-Jaime, O. A., León-Galván, M. F., and Núñez-Palenius, H. G. (2014). Virus fitopatógenos en insectos asociados al ajo. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 20(2), 147-156.
- González-Garza R. (2017). Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3), 591-610.
- Hu X.-X, Yan, L. E. I. Pei, W. A. N. G. Tang L. F.-, He C. Z., Yong, S. O. N. G., Xiong X. J., Nie X. Z. (2015). Development of a multiplex reverse transcription-PCR assay for simultaneous detection of garlic viruses. *Journal of Integrative Agriculture* 14(5), 900–908.
- Inoue, T.; Murai, T., and Natsuaki T. (2010). An effective system for detecting Iris yellow spot virus transmission by *Thrips tabaci*. *Plant Pathology* 59, 422–428.

- Katis, N., Maliogka V., and Dovas C. (2012). Viruses of the Genus *Allium* in the Mediterranean Region. In: G. Loebeinstein and H. Lecoq (eds.). *Advances in Virus Research*. Vol. 84. Elsevier Publishing. pp. 163-208.
- Kelaniyangoda, D. and Madhubashini, L. (2010). Indicator plants: Tools for detecting papaya ring spot potyvirus and cucumber mosaic cucumovirus. *Journal of Food and Agriculture* 1(2), 64–69.
- Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., and Delecolle, B. (1998). Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Dis.* 82,1381-1385.
- Lunello, P., Ducasse, D., and Conci, V. (2005). Improved PCR detection of potyviruses in *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology* 112, 371-378.
- Majumder S. and Baranwal V. K. (2014). Simultaneous detection of four garlic viruses by multiplex reverse transcription PCR and their distribution in Indian garlic accessions. *Journal of Virological Methods* 202, 34–38.
- Metcalf, C.L. y Flint, W.P. 1962. *Insectos Destructivos e Insectos Utiles: Sus Costumbres y su Control*. 4ta. ed. CECOSA, México. pp: 743-745.
- Mound, L. A. and Kibby, G. (1998). *Thysanoptera: An Identification Guide*. 2 ed. CAB International, Wallingford, UK. 70 p.
- Naidu, R. A. and Hughes, J. D. A. (2003). Methods for the detection of plant virus diseases. In *Proceedings of a Conference on Plant Virology in Sub Saharan Africa*, 4-8 June 2001, Ibadan, Nigeria, pp. 233-253.
- Nam M., Y. Lee, C. Y. Park, M. A. Lee, Y. S. Bae, S. Lim, J. H. Lee, J. S. Moon, and S. H. Lee. (2015). Development of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of garlic viruses and the incidence of garlic viral disease in garlic genetic resources. *The Plant Pathology Journal* 31, 90-96.



- Pérez-Moreno, L., Córdova-Rosales, Z. Barboza-Corona, E., Ramírez-Malagón, R., Ramírez-Lúa, J., Ruiz-Castro, S., and Silva-Rosales, L. (2006). First report of leek yellow stripe virus in garlic in the state of Guanajuato, Mexico. *Plant Dis.* 90,1458.
- Pérez-Moreno, L., Santiago-Gómez, D., Rico-Jaramillo, E., Ramírez-Malagón, R. y Mendoza-Celedón, B. (2008). Efecto de virus fitopatógenos sobre características agronómicas y calidad del ajo (*Allium sativum* L.), en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26,40-48.
- Pérez-Moreno, L., Navarro-León M. J., Ramírez-Malagón, R. y Mendoza-Celedón, B. (2010). Impacto e Identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad del ajo (*Allium sativum* L.), en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28, 97-110.
- Pramesh D. and V. K. Baranwal. (2015). Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) through meristem tip culture after solar or hot air treatment of cloves. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 90(2), 180-186.
- Roistacher C. N. (1991). Graft-transmissible Diseases of Citrus. Handbook for detection and diagnosis. IOCV, Riverside and FAO, Rome. 286 pp.
- Salomon, R. (2002). Virus diseases in garlic and the propagation of virus-free plants. In: *Allium Crop Science: Recent advances*. H.D. Ravinovich and L. Curra (eds.). pp311-327. Vabish Publishing.
- SIAP. (2018). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Información disponible en [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do). Fecha de consulta 9 de noviembre de 2017.
- Thompson, M., Al-Qattan, K. K., Bordia, T., and Ali, M. (2006). Including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol, and triglycerides. *Journal of Nutrition*. (Supplement) 136, 800S-802S.

- Triplehorn, C. A., Johnson, N. F. 2005. Chapter 23: Order Thysanoptera Thrips. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. Seventh Edition, Belmont, CA, USA: Brooks/Cole. p. 333-340.
- Van Dijk, P. (1993 a) Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. Netherlands Journal of Plant Pathology 99. Supplement 2, 1-48.
- Van Dijk, P. (1993 b). Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. Netherlands Journal of Plant Pathology 99 (5-6), 233-257.
- Velásquez-Valle, R., Chew-Madinaveitia, Y. I., Amador-Ramírez, M D. y Reveles-Hernández, M. (2010). Presencia de virus en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) en Zacatecas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 28,135-143.
- Walkey D. G. A. and Antill D. N. (1989). Agronomic evaluation of virus-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.). Journal of Horticultural Science 64, 53-60.
- Westphal, E. and Manson, D. C. (1996). Feeding effects on host plants: Galls formation and other distortions. In: Lindquist, E. E., Sabelis, M. W., and J. Bruin (eds.). Eriophyid Mites- Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier Science Publ. Amsterdam, The Netherlands. P. 231-242.
- Yamashita, K.; Sakai, J.; and Hanada, K. (1996). Characterization of a new virus from garlic (*Allium sativum* L.), garlic mite-borne mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62, 483-489.